具有双重抗生素抗性的ε-聚赖氨酸高产菌株选育及生理特性

赵俊杰，张龙，王靓，陈旭升，毛忠贵*

（江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）[1]

摘 要：以ε-聚赖氨酸产量为 1.60 g/L 的 *Streptomyces albulus* M-Z18 为出发菌株，利用核糖体工程技术选育具有双重抗生素抗性的ε-聚赖氨酸高产菌株，并对高产菌株和出发菌株的生理生化性能进行比较。通过链霉素诱变成功选育出了 1 株遗传稳定的ε-聚赖氨酸产生菌 *S. albulus* S-7，ε-聚赖氨酸产量为 2.03 g/L；对 *S. albulus* S-7 叠加巴龙霉素，获得 1 株遗传稳定的具有双重抗性的ε-聚赖氨酸产生菌 *S. albulus* SP-14，ε-聚赖氨酸产量为 2.37 g/L，比出发菌株 *S. albulus* M-Z18 的ε-聚赖氨酸产量增加了 48.10%。使用链霉素和巴龙霉素选育具有双重抗生素抗性的ε-聚赖氨酸高产菌株是一种有效的手段。

关键词：发酵工程；生理生化性能；双重抗生素抗性；ε-聚赖氨酸**2**

ε-聚赖氨酸（ε-Poly-L-lysine，ε-PL）是由 25-35 个 L-赖氨酸（L-Lys）单体经过α-COOH 及ε-NH_2 构成的酰胺键衔接而成。作为一种新型的食品防腐剂，ε-PL 具备无毒、抑菌谱广的独特性质，可以明显抑制革兰氏阳性菌、酵母和真菌等的生长[1]。此外，ε-PL 还具有不污染环境的特性，在生物医药行业被广泛使用。ε-PL 具备普遍的使用范围和庞大的市场价值，是一种新型生物技术产品。

用于产ε-PL的野生型菌株有很多，如 *Streptomyces noursei* NRRL 5126和 *Streptomyces griseofuscus* H1，但这两株菌的ε-PL生产能力较低，分别为0.42和0.70 g/L[2-4]，不适合用作工业微生物，必须通过菌种改良提高目的代谢物产量才能满足工业化的需求。近年来，把物理和化学诱变用于改进ε-PL产生菌的措施很多，例如，经过硫酸二乙酯对*Kitasatospora sp.*PL6-3[5]完成诱变，选育具有AEC抗性的菌株，最终获得一株突变菌MY5-36，ε-PL产量为1.17 g/L，较出发菌株高出3倍。也有学者采用等离子诱变和基因组改组技术对ε-PL产生菌进行改良。例如，2012年，Zong等[6]经过常压室温等离子体诱变，将*S. albulus* A-29的ε-PL产量从0.40 g/L提高至1.59 g/L。经过物理和化学等措施能够有效改善ε-PL产量，但这些均为传统育种方法，不仅耗时、耗力，且效率较低。

2007年日本学者Ochi等提出了一种新型诱变育种方法，即核糖体工程，该方法经过构建具有相应抗性的菌库，挑选核糖体突变的菌株，进而得到目的代谢物生产能力改善的菌株。1996年Ochi等[7]在*Streptomyces lividans*和*Streptomyces coelicolor* A3(2) 菌株内引入链霉素抗性，显著提高放线紫红素产量；2009年Wang等[8]在*Streptomyces coelicolor*中引入巴龙霉素抗性，显著提高了十一烷基灵菌红素和放线菌紫红素的产量。这些实验结果表明，核糖体工程是提高链霉菌次级代谢物产量的有效方法。但是，目前还未有研究报道把链霉素和巴龙霉素同时引入产ε-PL的菌株中。

基金项目：江苏省产学研合作前瞻性联合研究项目(BY2016022-25)

* 通讯作者：毛忠贵（1954-）男，江苏南京人，硕士，教授，博士研究生导师，主要从事发酵工业清洁生产的研究。E-mail: maozg@jiangnan.edu.cn

本文以一株小白链霉菌*S. albulus* M-Z18为出发菌株，通过引入链霉素抗性和巴龙霉素抗性提高菌株耐受抗生素能力的同时提高目的产物ε-PL的产量，并对高产菌株和出发菌株的生理生化性能进行比较。

1. 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

本实验室驯化保存的ε-PL 产生菌 *S. albulus* M-Z18。

1.1.2 培养基

固体培养基（BTN，g/L）：葡萄糖 10，鱼粉蛋白胨 2，酵母粉 1，琼脂 20，pH 7.50。

种子培养基（M3G，g/L）：葡萄糖 50，酵母粉 5，硫酸铵 10，磷酸二氢钾 1.36，磷酸氢二钾 0.80，七水合硫酸镁 0.50，七水合硫酸锌 0.04，七水合硫酸亚铁 0.03，pH 6.80。

优化培养基(YP/YG，g/L)：葡萄糖 30/甘油 60，酵母粉 8，硫酸铵 5，七水合硫酸镁 0.50，磷酸二氢钾 2，七水合硫酸锌 0.04，七水合硫酸亚铁 0.03，pH 7.50，碳源为葡萄糖时缩写为 YP，碳源为甘油时缩写为 YG。

RSM 培养基(g/L)：甘油 60，酵母粉 10，硫酸铵 5，七水合硫酸镁 0.80，磷酸二氢钾 4，七水合硫酸亚铁 0.05，pH 6.80。

所用培养基均在 115 ℃高压蒸汽灭菌 15 min。

1.2 方法

1.2.1 单孢子悬浮液的制备

取保藏于-80 ℃冰箱的甘油管，解冻后涂布到固体平板，30 ℃培养 8 d。参照文献[9]制备单孢子悬浮液。用适量的无菌水冲洗固体平板上的孢子，收集孢子进行漩涡振荡，并用纱布过滤，得到单孢子沉淀。然后用无菌水冲洗沉淀至无杂质，再调整孢子浓度为 10^9 CFU·mL^{-1} 左右。

1.2.2 最小抑菌浓度（MIC）的测定

取 *S.albulus* M-Z18 的孢子悬浮液，适当稀释，调整孢子浓度为 10^6 CFU·mL^{-1} 左右，涂布到抗性平板，每个浓度设置 3 个平行。察看菌落生长状况，并记下没有菌落生长的临界浓度，即抗生素对该菌的 MIC。培养条件：30 °C 培养 6 d。

1.2.3 选育抗链霉素的ε-PL 高产菌株

取菌株的孢子涂布到含 7-10 mg/L 链霉素的抗性平板上，30 ℃培养 8-10 d。挑选直径较大且孢子浓密的单菌落进行扩培，30 ℃培养 8 d 后，利用高通量体系进行初筛[10]。随后，对初筛结果进行统计并计算正突变率（R_P）和突变率（R_M）：将产量较出发菌株提高 5%以上的菌株记为正突变菌株（P），产量低于出发菌株 5%的菌株记为负突变菌株（N）。随后，为进一步验证正突变菌株产量的准确性，对产量提升 5%以上的菌株进行摇瓶复筛，同时计算正突变率（R_P）和突变率（R_M），统计方法同初筛。

总突变株数（M）、正突变率（R_P）和突变率（R_M）计算方法如下：

$$M = P + N$$

$$RM = (M/T) \times 100\%$$

$$RP = (P/M) \times 100\%$$

其中，T 是所挑选的所有单菌落数目，M 是总突变菌株的个数，P 是正突变菌株的个数，N 是负突变菌株的个数。

1.2.4 选育双重抗性ε-PL 高产菌株

取 S-7 的孢子悬浮液，适当稀释，涂布到含有巴龙霉素的抗性平板上，30 ℃培养 8-10 d。挑选直径较大且孢子量丰富的单菌落进行扩培，30 ℃培养 8 d 后，利用高通量体系完成初筛并进行摇瓶复筛，对初筛和复筛结果进行分析，方法同 1.2.3。保藏复筛中产量最高的 3 株ε-PL 双重抗性突变菌株。

1.2.5 初筛和复筛

初筛：用牙签刮取适量的孢子，接种至含 2 mL YG 培养基的 24 深孔板中。培养条件：30 °C、200 r/min，96 h。发酵结束的样品，通过甲基橙法[11]检测ε-PL 浓度。

复筛：取菌株孢子接种至 YG 培养基，培养 24 h；转接种子液到含 40 mL YG 培养基的 250 mL 摇瓶中，继续培养至 96 h，检测ε-PL 浓度，选出高产菌株。

1.3 **高低产菌株生理生化性能差异分析**

1.3.1 固体培养基上的菌丝形态

取 M-Z18 和 SP-14 的孢子悬浮液涂布于固体培养基，30 ℃培养至长出白色菌丝，扫描电子显微镜下察看菌丝状态。

1.3.2 固体培养基上的孢子形态

取 M-Z18 和 SP-14 的孢子悬浮液涂布于固体培养基，30 ℃下培养至长出孢子，扫描电子显微镜下察看孢子状态。

1.3.3 液体培养基中菌球形态

取 M-Z18 和 SP-14 的孢子，YG 培养基中培养 24 h，转接种子液于 YG 培养基继续培养，设置多个取样点观察菌球形成和裂解的情况，普通光学显微镜下察看菌球状态。

1.3.4 抵抗抗生素能力

取 M-Z18 和 SP-14 的孢子，进行适宜稀释，使其浓度为 10^6 CFU·mL^{-1} 左右，涂布于抗性平板，30 ℃培养，察看菌落生长状况。

1.3.5 不同培养基对ε-PL 摇瓶发酵产量的影响

取 M-Z18 和 SP-14 的孢子，M3G、YG、YP 和 RSM 四种培养基中培养 4 d，各设置三个平行，对比高产菌株和出发菌株的ε-PL 摇瓶发酵产量。

1.3.6 高低产菌株摇瓶自然发酵过程比较

取 M-Z18 和 SP-14 的孢子，接种于 YG 培养基，30 ℃、200 r·min^{-1} 培养 1 d，转接至 YG 培养基发酵 3 d，对发酵过程的 pH、甘油消耗、菌体干重以及ε-PL 浓度进行分析比较。

1.3.7 ε-PL 代谢途径关键酶活力测定

取 M-Z18 和 SP-14 的孢子分别接种至含 YG 培养基中。48 h 后，取菌液离心，4500×g、15 min，收集菌体；用 0.20%的 KCl 洗涤菌体并离心，4500×g、15 min，重复两遍，收集菌体悬浮于 100 mmol/LTris-HCl (pH 7.50)中，其中 1 g 菌体需要 5 倍的缓冲液。菌体经超声破碎后进行离心，12000×g、20 min，上清即为粗酶液。磷酸戊糖（PPP）途径关键酶 6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH）、糖酵解（EMP）途径及三羧酸（TCA）循环关键酶丙酮酸激酶（PK）和柠檬酸合酶（CS）、回补途径关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）与丙酮酸羧化酶（PYC）、二氨基庚二酸（DAP）途径天冬氨酸激酶（ASK）、以及ε-PL 合成途径关键酶ε-PL 合成酶，酶活力检测方法参考文献[12]。

2. 结果与分析

2.1 抗生素最小抑菌浓度（MIC）

图 1（1）是 *S.albulus* M-Z18 在含有不同浓度链霉素的固体平板上的菌落生长情况，在不加抗生素的平板上（图 1（1）A），菌株生长 6 天孢子较为浓密；在抗生素浓度为 2 mg/L 时（图 1（1）B），平板上呈现出稀疏的菌落，且菌落的孢子颜色较浅，说明抗生素抑制了菌的生长；继续增加抗生素的浓度，明显地看到菌落数目呈现递减趋势，且看不到孢子的形成。当链霉素的浓度为 6 mg/L（图 1（1）D）时，菌株的生长被完全抑制，因此确定链霉素对 M-Z18 的最小抑菌浓度为 6 mg/L。相同方法测定 Par 的最小抑菌浓度，图 1（2）是 M-Z18 在含有不同浓度巴龙霉素的固体平板上的菌落生长情况，当巴龙霉素浓度为 6 mg/L（图 1（2）B）时，与对照组图 1（2）A 相比，M-Z18 的生长受到了明显的抑制，菌落数目很少且不长孢子，当浓度为 9 mg/L 时（图 1（2）C）平板上几乎没有单菌落的存在，因此确定巴龙霉素对 M-Z18 的最小抑菌浓度为 9 mg/L。

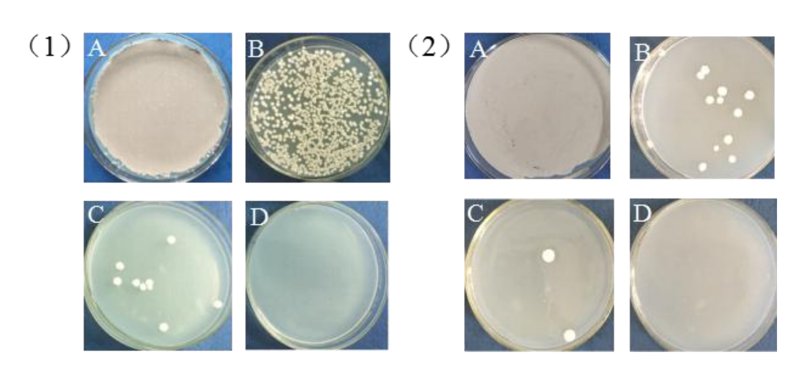


图 1 *S.albulus* M-Z18 在不同浓度链霉素和巴龙霉素的固体平板上的生长情况

Fig.1 The growth of *S.albulus* M-Z18 on solid plate contained with different streptomycin and paromomycin concentration on 6th day

注：（1）A：0 mg/L；B：2 mg/L；C：4 mg/L；D：6 mg/L；（2）A：0 mg/L；B：6 mg/L；C：9 mg/L；D：10 mg/L；

2.2 选育抗链霉素的ε-PL 高产菌株

将 *S.albulus* M-Z18 孢子涂布在含有链霉素的平板上，30 ℃培养 8 d，从平板上共挑出 112 株菌，为构建的菌库。经过高通量体系的初筛和摇瓶复筛验证，发现 23 株菌产量发生改善，获得了 54.76%的正突变率（表 2）；目的产物摇瓶平均产量为 1.95±0.10 g/L，相比于出发菌株 *S.albulus* M-Z18 提高了 21.88%，获得一株突变菌株 S-7，产量为 2.03±0.10 g/L（表 1）。

对初筛和复筛的突变结果进行统计分析，从表 2 可以看出，利用链霉素抗性筛选突变菌株，初筛的突变率可以达到 40.18%（选取高于和低于出发菌株产量 5%的作为突变菌株），正突变率达到 57.78%。随后，对初筛获得的正突变菌株进行摇瓶复筛，验证正突变菌株的发酵水平。复筛的结果表明正突变率仍然很高，达到了 54.76%。与利用常压室温等离子体诱变茂源链霉菌[13]达到的最高正突变率 32%相比，通过链霉素抗性对小白链霉菌 *S.albulus* M-Z18 进行菌种选育获得的正突变率高出前者约 20%，这说明，利用核糖体工程选育具有链霉素抗性的ε-PL 高产菌株效率更高，更易获得正突变菌株。

链霉素抗性突变主要发生在核糖体 S12 蛋白上，如 K88R 和 R86H 等突变[14]。为了进一步了解链霉素突变菌株的高产机制，有学者对高产突变菌株的核糖体进行研究，结果发现在低镁离子浓度下核糖体 70S 复合体的稳定性显著提高，与核糖体-mRNA-tRNA 终止复合体

解离密切相关的核糖体循环因子表达水平也明显上升了，核糖体循环因子水平的提高导致了高产突变菌株生长稳定期后期异常增强的蛋白合成活性，最终使目的代谢物超量表达[15-16]。

2.3 选育双重抗性ε-PL 高产菌株

将 S-7 的孢子涂布在含巴龙霉素的固体培养基上，抗生素的浓度为 9~36 mg/L，30 ℃培养 8 d。结果发现，抗性平板上长出的单菌落只有菌丝不长孢子甚至有不长菌丝的现象，这说明筛选所用的抗生素浓度过高，严重抑制了菌株的生长。抗性平板浓度的设定应该保证两点，既要对菌株有抑制作用，又必须确保该浓度下存在生长较好的菌落[17]。因此，对巴龙霉素浓度进行调整，如图 2 所示，菌株 S-7 在不加抗生素的平板上（A）生长较好且孢子浓密，随着抗生素浓度的增加，平板上菌落数目逐渐减少，同时伴随着长孢子能力降低，当抗性浓度为 6.3 mg/L（E）时，部分菌落长出孢子，而在抗性浓度为 8.1 mg/L（F）时，所有的菌落都未长孢子。工业微生物的重要特质是要具有遗传稳定性，在菌种选育时，应以菌株的遗传稳定性为前提，提高菌株的产量。根据图 2 结果，确定筛选所用巴龙霉素浓度为 4.5 mg/L 和 6.3 mg/L。

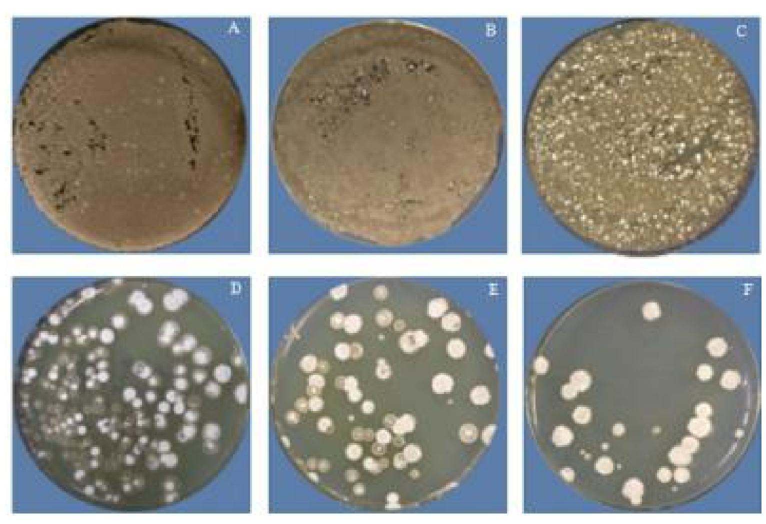


图 2 *S.albulus* S-7 在不同浓度巴龙霉素的固体平板上的生长

Fig.2 The growth of *S. albulus* S-7 on solid plate contained with different paromomycin concentration on 6th day

注：A：0 mg/L；B：0.9 mg/L；C：2.7 mg/L；D：4.5 mg/L；E：6.3 mg/L；F：8.1 mg/L

从抗性平板上共挑选单菌落 61 株，经过高通量体系的初筛和摇瓶复筛后，发现 6 株菌ε-PL 产量得到改善，正突变率为 31.58%（表 2）；目的产物摇瓶平均产量为 2.30±0.10 g/L，比出发菌株 S-7 提高了 13.30%，获得一株突变菌株 SP-14，产量为 2.37±0.10 g/L（表 1）。同时，双抗（链霉素和巴龙霉素）菌株的正突变率（31.58%）比单抗（链霉素）菌株正突变率（54.76%）低，这说明双重抗性叠加可以进一步提高ε-PL 产量，但突变菌株ε-PL 产量提高的效率可能随着其抗性的增加而降低。但是与化学诱变[18]达到的 16.67%的正突变率相比，通过叠加抗生素抗性获得ε-PL 高产菌的正突变率仍然很高。

表 1 筛选抗性菌株结果统计

Table 1 The statistical data of screening the drug-resistant mutants experiment

筛选方法	出发菌株	筛选浓度	平均产量（$g \cdot L^{-1}$）	最高产量（$g \cdot L^{-1}$）
筛选链霉素抗性菌株	M-Z18（1.60 g/L）	链霉素：7-10 mg/L	1.95±0.10	2.03±0.10
筛选双重抗性菌株	S-7（2.03 g/L）	巴龙霉素：4.5-6.3 mg/L	2.30±0.10	2.37±0.10

表 2 突变结果统计

Table 2 The statistical data of mutation results

筛选过程	突变数（M）	正突变数（P）	总菌落数（T）	突变率 R_M（%）	正突变率 R_P（%）
链霉素初筛	45	26	112	40.18	57.78
链霉素复筛	42	23	112	37.50	54.76
双重抗性初筛	19	7	61	31.15	36.84
双重抗性复筛	18	6	61	29.51	31.58

Wang 等[19]研究发现巴龙霉素抗性可以导致 rpsl 基因发生突变，在天蓝色链霉菌核糖体蛋白 S12 的 92 位点插入一个甘氨酸残基。这种插入突变（GI92）导致巴龙霉素抗性水平增加 20 倍，同时使抗生素超量表达。这表明添加巴龙霉素可以作为一种手段提高菌株目的产物产量。

2.4 高低产菌株生理生化性能差异分析

2.4.1 菌丝和孢子形态

以 *S.albulus* M-Z18 为出发菌株，获得双重抗性菌株 SP-14，2 株菌的菌丝和孢子形态如图 3。从图中看出 M-Z18（A-1）的菌丝表面有很多小的圆的囊泡，SP-14（B-1）的菌丝表面也存在很多小的白色的颗粒状物质，但这些颗粒状物质在菌丝形成孢子后才逐渐长成囊泡。这一差异是由于 SP-14 诱变后，生长速率受到了影响，在相同生长时间内 SP-14 菌丝表面还未形成明显的囊泡，直至形成孢子时，囊泡才成型。且相比于 M-Z18，SP-14 的菌丝有干瘪的现象。

比较 2 株菌的孢子形态，从图 3 可以看出，M-Z18（A-2）的孢子表面刺少且小，SP-14（B-2）的孢子表面有分布均匀的刺状物，根据刺的形状，属尖型针状凸起[20]。此外，孢子数也存在差别，M-Z18 的孢子密集，而 SP-14（B-2）的孢子数减少，说明诱变后菌株长孢子能力减弱。

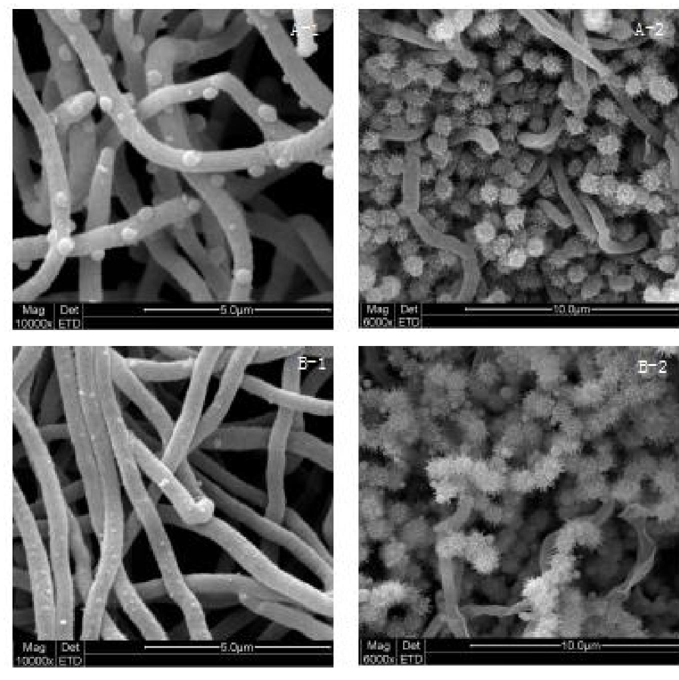


图 3 *S.albulus* M-Z18（A）和 SP-14（B）在固体平板上的菌丝以及孢子形态差异

Fig.3 Comparison of *S. albulus* M-Z18 and SP-14 on mycelium and spore morphology

2.4.2 菌球形态差异

为了进一步了解发酵过程中菌体表现出的不同生长状态，观察 YG 培养基中不同时间点 M-Z18 和 SP-14 的菌球形态。不同的菌球形态会影响菌株发酵过程的氧气和养料成分获取。从图 4 可知，SP-14 在 24 h 时菌体呈线型，M-Z18 已形成菌球，说明 SP-14 的生长速率减慢。培养 48 h 后，2 株菌均呈现出各自的菌球形态，SP-14 的菌球比 M-Z18 略小，菌球中心占的体积较小且呈空心状，M-Z18 的菌球中心呈黑色，这意味着突变后菌株的生长受到的影响。从图 4 中的 A-96 可以清楚的看到，M-Z18 此时呈现出裂解现象，有很多断裂的菌丝，菌球形态已经不完整，而 SP-14（B-96）的菌球形态相比于 48 h，仍然保留较为完整，只是菌球中心部分的体积变小了。相比于最早形成菌球的 M-Z18，SP-14 生长缓慢，这和图 3 的结果具有相关性，相同培养条件和生长时间，SP-14 的孢子数和长孢子能力低于 M-Z18。

有学者探讨并研究了菌体在不同碳氮源以及碳氮比例时呈现出的不同菌球形态。结果表明，菌球形态的差异会导致发酵液流变性有差别，而发酵液的流变性对营养物质和氧的传递又会造成影响，进而影响代谢，最终对目的产物的合成造成不同的影响[21]。此外，在发酵中后期，当菌球保持一定体积的球核时，对合成目的产物十分有利。SP-14 的优势在于后期仍保持较为完整的菌球形态，使菌株持续发酵产能。

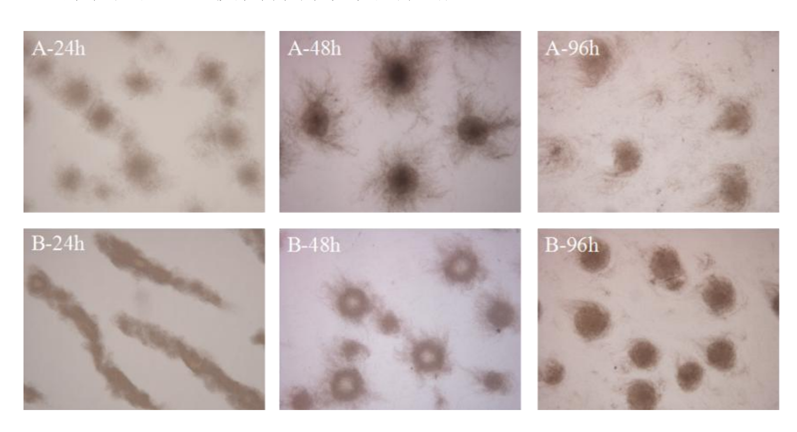


图 4 *S.albulus* M-Z18（A）和 SP-14（B）在摇瓶中发酵过程中不同时间点菌体形态比较（100×）

Fig.4 Comparison of *S.albulus* M-Z18 and SP-14 on pellet morphology at different time during fermentation （100×）

2.4.3 抵抗抗生素能力

通过核糖体工程技术对菌株 *S.albulus* M-Z18 进行选育，获得了具有链霉素抗性和链霉素巴龙霉素抗性的菌株。研究结果发现，这些诱变菌株的ε-PL 合成能力得到提升的同时，菌株自身对于其他种类抗生素的耐受能力也会发生变化。很多学者的研究也曾证实了该种现象。文中对 *S.albulus* M-Z18、S-7 和 SP-14 以及实验中涉及的其他抗性菌株进行抗生素耐受能力测定。察看菌株在不同抗生素浓度的固体平板上的生长状况，获得各菌株抗性。

从表 3 中可以发现：（1）菌株的真实抗性水平均高于对菌株筛选时所加抗生素浓度，这是因为菌株在发生抗性突变后，自身耐受抗生素能力进一步得到提升；（2）在巴龙霉素抗性筛选过程中，发现巴龙霉素对菌株的生长抑制作用较强，当选用和链霉素一样的筛选策略进行抗生素浓度确定时，在巴龙霉素抗性平板上无菌落和孢子形成，因此设计如图 2 所示的筛选方案，结果表明，虽然在较低筛选浓度下获得突变菌株，但从表中数据可以发现突变菌株的真实抗性仍发生了很大变化；（3）对菌株叠加抗生素链霉素之后，其耐受巴龙霉素的能力也得到了提升，同样的，叠加巴龙霉素则菌株耐受链霉素能力也增强，说明菌株诱变之后，其抵抗不同抗生素的能力会同时得到提升。

表 3 菌株抗性

Table 3 the drug-resistance of the strains used in this study

菌株编号	出发菌	筛选抗生素浓度（mg·L-1）	ε-PL 产量（g·L-1）	抗性（mg·L-1）	
				Str	Par
M-Z18	出发菌		1.60	6.00	9.00
S-3	M-Z18	6.00（链霉素）	2.03	7.00	15.00
S-7	M-Z18	6.00（链霉素）	2.03	7.00	15.00
S-47	M-Z18	6.00（链霉素）	2.02	7.00	15.00
SP-1	S-7	10.50（巴龙霉素）	2.20	25.00	20.00
SP-14	S-7	7.50（巴龙霉素）	2.37	40.00	28.00

2.4.4 不同培养基对ε-PL 发酵产量的影响

在育种工作中，一般经过改造的高产菌株由于目标代谢产物产量出现较大提升，营养需求上往往也会发生较大改变。对比 M-Z18、SP-14 在本实验室现有的四种培养基 M3G、RSM、YG 和 YP 中的摇瓶发酵产量，考察菌株营养需求的变化。

从图 5 可以看出，SP-14 在不同培养基上ε-PL 产量差距情况（YG 培养基＞RSM 培养基＞YP 培养基＞M3G 培养基）与出发菌株 M-Z18（RSM 培养基＞YG 培养基＞YP 培养基＞M3G 培养基）存在不同；M-Z18 在 RSM 培养基中产量最高为 1.59 g/L，而菌株 SP-14 在 YG 培养基中产量最高为 2.32 g/L。这可能是由于菌株 SP-14 经过两轮的育种改造，内部的ε-PL 合成途径与出发菌株有了较大不同，SP-14 在每一种培养基中ε-PL 发酵产量都高于 M-Z18，这说明ε-PL 合成能力得到了加强。

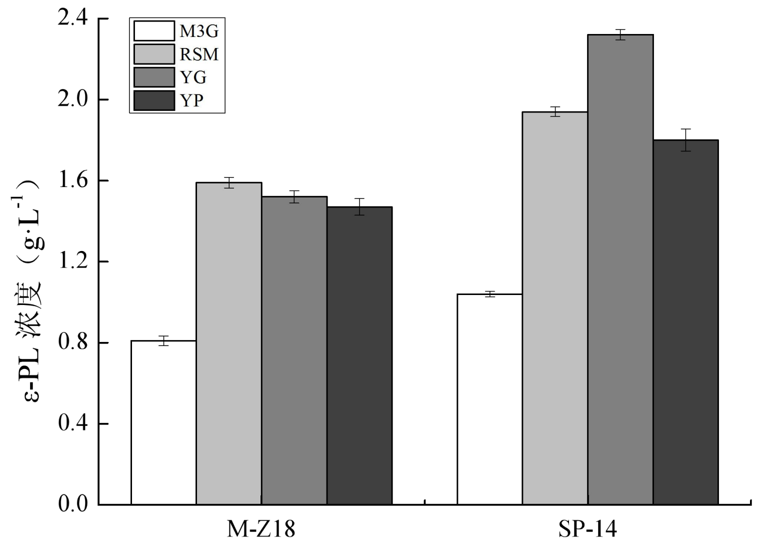


图 5 *S.albulus* M-Z18 和 SP-14 在不同培养基中发酵ε-PL 产量对比

Fig.5 Comparison the ε-PL production of *S.albulus* M-Z18 and SP-14 at different medium

2.4.5 摇瓶自然发酵过程比较

菌株 *S.albulus* M-Z18 摇瓶产量约 1.60 g/L，遗传性状稳定。本研究以优良菌株 M-Z18 为基础，利用核糖体工程育种技术，得到了一株ε-PL 摇瓶产量达到了 2.37 g/L 的 *S.albulus* SP-14。为了更好的认识出发菌株 M-Z18 与 SP-14 的区别，将这两株菌进行了摇瓶自然发酵（YG 培养基），对比相关参数，主要包括 pH、底物甘油的消耗、菌体干重以及ε-PL 产量。

结果如图 6 所示：测定参数的变化基本呈相同趋势。pH 值在 20~40 h 内急剧下降，由最初的 7.5 降为 4.0 左右，此后 pH 值开始缓慢下降，整个过程中 SP-14 与出发菌株 M-Z18 的 pH 值无明显的差别；两株菌甘油的量变化趋势相同，*S.albulus* M-Z18 的消耗速度略高于

SP-14，是由于突变菌株 SP-14 经过多轮的诱变后生长受到影响；*S.albulus* M-Z18 的菌体干重（在 66 h 时达到最大值 6.26 g/L）高于 SP-14；从图中可以看出两株菌发酵 24h 时还未合成产物，发酵 30 h 后可以检测到ε-PL 的浓度，从斜率可以看出，SP-14 合成ε-PL 的速率一直高于 M-Z18，这可能得益于 SP-14 的ε-PL 合成途径发生了变化，ε-PL 合成能力加强。

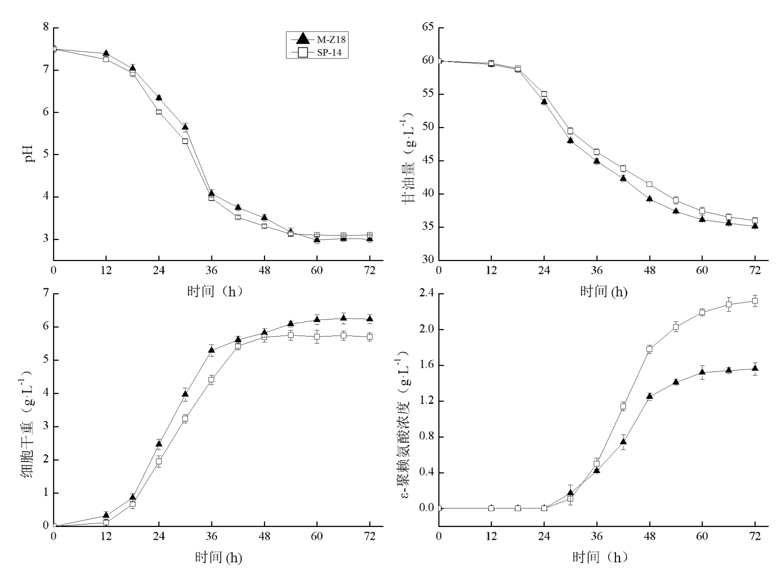


图 6 ***S.albulus* M-Z18 和 SP-14 摇瓶自然发酵比较**

Fig.6 The shake flask fermentation comparison between *S.albulus* M-Z18 and SP-14

2.4.6 ε-PL 合成相关的中心碳代谢途径中关键酶酶活性分析

对 M-Z18 进行抗生素诱变后，获得高产菌株 SP-14，其ε-PL 产量提升了 48.10%。为了从生理代谢水平进一步探究 SP-14 的高产机制，因而对以下关键酶酶活进行了初步研究，这些关键酶均存在于和ε-PL 合成相关的核心碳代谢途径中。

磷酸戊糖（PPP）途径的碳代谢为菌体细胞生长和代谢物合成提供戊糖和还原 NADPH，G6PDH 是 PPP 途径的第一个限速酶。从图 7A 可知，相比于 M-Z18，菌株 SP-14 表现出了更高的酶活力，这说明菌株 SP-14 可以合成更多的戊糖，有利于菌体细胞的生长。因此可以通过改造菌株强化 PPP 途径关键酶活力来提升该途径的代谢能力。

EMP 途径代谢末端产物丙酮酸是随后 TCA 循环所需的碳骨架。而关键酶 PK 的活力直接关系到这些碳骨架进入 TCA 循环的通量大小。如图 7A 所示，相比于 M-Z18，抗性菌株 SP-14 的 PK 活力高出了 2 倍左右，因此可通过强化 EMP 途径代谢能力为 TCA 循环提供更多的碳骨架。TCA 循环主要用于合成 NADH 和 FADH2，并为其他代谢产物合成前体，如前体 L-Lys 合成所需的草酰乙酸。从图 7A 可知，相比于 M-Z18，SP-14 的 CS 活力高出了 1.70 倍左右，有助于细胞合成更多的 NADH 用于呼吸产能。

草酰乙酸是 L-Lys 合成的碳骨架前体，在ε-PL 合成中大量的 L-Lys 会被消耗，因此细胞胞内草酰乙酸是相对稀缺的。但 TCA 循环净产出物质并不包括草酰乙酸，所以细胞需要通过 PEPC 与 PYC 来进行回补。从图 7A 可以发现，SP-14 的 PEPC 以及 PYC 活力均比 M-Z18 有所提高，说明 SP-14 细胞对草酰乙酸的回补能力更强，这有利于前体 L-Lys 合成。

细菌中 L-Lys 是由 L-天冬氨酸（L-Asp）经 DAP 途径合成，而该途径又是由 ASK 催化的 L-Asp 磷酸化作用开始的。所以，ASK 作为 DAP 途径关键酶直接影响着 L-Lys 的供应能力。如图 7A 所示，SP-14 的 ASK 活力提升了 2 倍，推测突变菌株细胞有很强的 L-Lys 合成代谢能力，为ε-PL 的合成供应大量的 L-Lys。为验证这一推测，对菌株的胞内 L-Lys 含量进行检测。由于ε-PL 是由 L-Lys 聚合而成的，所以ε-PL 合成酶的酶活通过单位时间内 L-Lys

的减少量来定义。图 7B 显示的是出发菌株 *S.albulus* M-Z18 和突变菌株 SP-14 的 Pls 酶活。从图中可以看出，高产突变菌株的 Pls 酶活明显高于出发菌株 M-Z18，所以，ASK 可以为ε-PL 的合成提供大量的 L-Lys，用于合成目的产物。

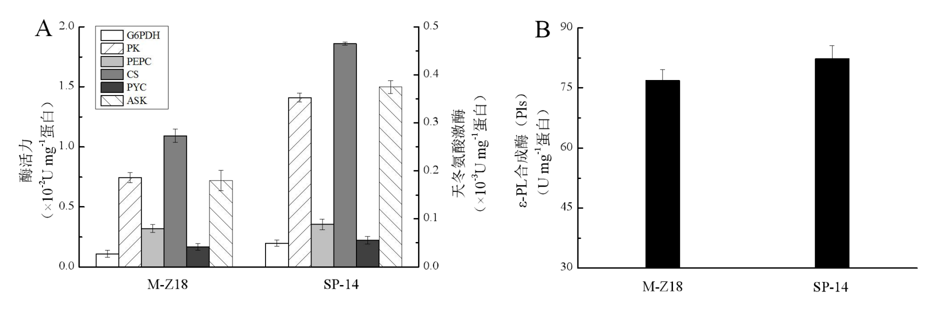


图 7 *S.albulus* M-Z18 和 SP-14 在摇瓶发酵过程中的酶活力比较

Fig.7 Enzymatic activity of *S.albulus* M-Z18 and SP-14 during fermentation in 250 mL shake flask

3. 结论

本文的研究是基于核糖体工程进行的菌株改良，主要是使用链霉素和巴龙霉素两种抗生素完成抗性筛选，获得突变菌株 *S.albulus* S-7 和 SP-14，ε-PL 摇瓶产量分别为 2.03 g/L 和 2.37 g/L，较出发菌株 M-Z18 分别提高了 26.90%和 48.10%。其中，对单重抗性菌株 S-7 叠加巴龙霉素后，获得双重抗性突变菌株 SP-14，其ε-PL 的产量显著提高，可能是巴龙霉素引入的突变与链霉素引入的突变相结合，突变体 SP-14 比 S-7 在稳定期后期积累更高水平的核糖体循环因子，高水平的核糖体循环因子也是具有高水平的蛋白合成活性的基础，该结果表明了引入多重抗性突变对改善代谢物产量的有效性。对 *S.albulus* M-Z18 和 SP-14 的生理生化性能进行研究，发现诱变后的菌株菌丝、孢子以及菌球形态均发生了不同程度的变化。测试不同培养基中摇瓶发酵后的ε-PL 产量，结果表明，突变菌株的营养需求发生了变化，最有利于产ε-PL 的培养基是优化培养基（YG）。此外对与菌体生长和ε-PL 合成相关的关键酶进行了研究，结果表明高产菌株较出发菌株的 G6PDH、PK、PEPC、CS、PYC、ASK 和 Pls 酶活性均呈现不同幅度的提升。这表明，能够通过改善菌株耐受抗生素的能力以及叠加抗生素抗性对低产菌株改造，达到强化小白链霉菌中与ε-PL 合成相关的代谢能力的目标。

参考文献：

[1] 孟岳成，王欣伟，李延华，等. ε-聚赖氨酸对黄曲霉的作用机制初探[J].食品科技，2016 (12):239-244
Meng Y C， Wang X W， Li Y H， et al. Preliminary study on the mode of action of ε-polylysin against Aspergillusflavus[J]. Food Science and Technology，2016(12): 239-244

[2] 石慧，李婵娟，张俊红.ε-聚赖氨酸产生菌及其应用研究概述[J].食品与发酵工业，2016，42(9):263-269
Shi H, Li C J, Zhang J H. Research progress on the ε-polylysine producing strains and its application[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(9): 263-269

[3] Bankar S B， Singhal R S.Optimization of poly-ε-lysine production by Streptomyces noursei NRRL 5126[J].Bioresource technology，2010，101(21):8370-8375

[4] Zhang C，Zhang D R，He W，et al.A simple and sensitive method for screening ε-PL producing strains from soils[J].Journal of Shandong University (Health Sciences)，2006，44(11):1104-1107

[5] 陈玮玮, 朱宏阳, 徐虹. ε-聚赖氨酸高产菌株选育及分批发酵的研究[D]. 2007.

[6] Zong H，Zhan Y，Li X，et al.A new mutation breeding method for Streptomyces albulus by an atmospheric and room temperature plasma[J].African Journal of Microbiology Research，2012，6(13):3154-3158

[7] Shima J，Hesketh A，Okamoto S， et al.Induction of actinorhodin production by rpsL (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in Streptomyces lividans and Streptomyces coelicolor A3 (2)[J].Journal of bacteriology，1996，178(24): 7276-7284
[8] Wang G，Inaoka T，Okamoto S，et al.A novel insertion mutation in Streptomyces coelicolor ribosomal S12 protein results in paromomycin resistance and antibiotic overproduction[J].Antimicrobial agents and chemotherapy，2009，53(3): 1019-1026
[9] Hopwood D A， Bibb M J， Chater K F， et al.Genetic Manipulation of Streptomyces; A Laboratory Manual[J].Journal of Cell Biology，1985，56(3):388-399
[10] Liu Y J，Chen X S，Zhao J J，et al.Development of Microtiter Plate Culture Method for Rapid Screening of ε-Poly-L-Lysine-Producing Strains[J].Applied Biochemistry and Biotechnology，2017: 1-15
[11] Itzhaki R F.Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine[J].Analytical Biochemistry，1972，50(2): 569-574
[12] Zeng X，Chen X S，Ren X D，et al.Insights into the role of glucose and glycerol as a mixed carbon source in the improvement of ε-poly-l-lysine productivity[J].Applied biochemistry and biotechnology，2014，173(8): 2211-2224
[13] 田淑翠,牛延宁,常忠义,等.常压室温等离子体(ARTP)诱变茂源链霉菌菌株[J].中国生物工程杂志,2016,36(09):47-53
Tian S C, Niu Y N, Chang Z Y， et al.The Streptoverticillium Mobaraense Mutagenesis Using Atmospheric Pressure Plasma at Room Temperature（ARTP）Method [J]. Journal of Chinese Biotechnology, 2016, 36(09): 47-53
[14] Shima J，Hesketh A，Okamoto S，et al.Induction of actinorhodin production by rpsL (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in Streptomyces lividans and Streptomyces coelicolor A3 (2)[J].Journal of bacteriology，1996，178(24): 7276-7284
[15] Okamoto-Hosoya Y， Hosaka T， Ochi K.An aberrant protein synthesis activity is linked with antibiotic overproduction in rpsL mutants of Streptomyces coelicolor A3 (2)[J].Microbiology， 2003， 149(11): 3299-3309
[16] Hosaka T，Xu J，Ochi K.Increased expression of ribosome recycling factor is responsible for the enhanced protein synthesis during the late growth phase in an antibiotic‐overproducing Streptomyces coelicolor ribosomal rpsL mutant[J].Molecular microbiology，2006，61(4): 883-897
[17] 蒋永飞，陈萍，巫秋萍.达托霉素生产菌的激光诱变及组合抗性筛选[J]. Advances in Microbiology，2016，5(03): 19
Jiang Y F，Chen P，Wu Q P. Laser Mutation and Combined Antibiotics Resistance Selection to Daptomycin Producing Strains[J]. Advances in Microbiology, 2016, 5(03): 19
[18] 胡凯建,吴爱祥,王洪江,等.产氨菌化学诱变及浸出低品位铜矿试验研究[J].中南大学学报(自然科学版),2016,47(10):3289-3294
Hu K J, Wu A X, Wang H H， et al.Experimental Study on Chemical Mutation of Ammonia-producing Bacteria and Bioleaching of Low Grade Copper Ore [J]. Journal of Central South University(Science and Technology), 2016, 47(10): 3289-3294
[19] Wang G，Inaoka T，Okamoto S，et al.A novel insertion mutation in Streptomyces coelicolor ribosomal S12 protein results in paromomycin resistance and antibiotic overproduction[J].Antimicrobial agents and chemotherapy，2009，53(3): 1019-1026
[20] 丁鑑，张忠泽，刘惠敏，等.用扫描电镜观察链霉菌的孢子形态[J].微生物学报，1981，2: 002
Ding J, Zhang Z Z, Liu H M, et al. Spore Morphology of Streptomyces Viewed by Scanning Electron Microscopy[J]. Acta microbiologica Sinica, 1981, 2: 002
[21] 陈凝，王永红，储炬，等.培养基成分和补料对阿维菌素发酵过程中除虫链霉菌菌丝形态的影响[J].华中农业大学学报，2007，26(4): 496-501
Chen N, Wang Y H, Chu J, et al. Effect of Medium Composition and Feeding Strategy on Morphology of Streptomyces avermitilis in Avermectin Fermentation[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2007, 26(4): 496-501

Breeding and physiological characteristics of ε-polylysine high-producing strain with double antibiotic resistance

ZHAO Jun-jie，ZHANG Long，WANG Liang，CHEN Xu-sheng，MAO Zhong-gui*

（Key Lab of Industrial Biotechnology，of Education，School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract: *Streptomyces albulus* M-Z18 with 1.60 g/L yield of ε-Poly-L-lysine was used as initial strain to screen high-yield mutant，then compared the physiological and biochemical properties of high-yield mutant with M-Z18.The ribosomal engineering technology was used to breed the high-yield mutant with double antibiotic resistance. A genetically stable strain named S-7, was successfully screened by streptomycin mutagenesis. The ε-Poly-L-lysine yield of S-7 was 2.03 g/L. S-7 was used as initial strain to screen mutant with paromomycin，and obtained SP-14, with 2.37 g/L yield of ε-Poly-L-lysine. The use of streptomycin and paromomycin to breed high-yield mutant with high antibiotic resistance is an effective method.

Keyword: fermentation engineering；physiological and biochemical property；double drug resistance；ε-poly-L-lysine